

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-229200

(43) 公開日 平成4年(1992)8月18日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	A	8114-4B		
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/25		6807-4B		
		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数8(全11頁)

(21) 出願番号	特願平3-219720	(71) 出願人	391008788 アボット・ラボラトリーズ ABBOTT LABORATORIES アメリカ合衆国60064-3500イリノイ州ア ボット・パーク、ワン・アボット・パー ク・ロード (番地の表示なし)
(22) 出願日	平成3年(1991)8月30日	(72) 発明者	キース・シー・パツクマン アメリカ合衆国01730マサチューセッツ州 ベッドフォード、カーライル・ロード200 番
(31) 優先権主張番号	5 7 5 1 7 7	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(32) 優先日	1990年8月30日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良LCR法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 リガーゼ連鎖反応 (Ligase Chain Reaction: LCR) による核酸配列の検出方法を提供する。

【構成】 試料中の目的核酸に対してリガーゼ連鎖反応 (LCR) を行う方法において、該LCRを行う前に第一鋳型依存制御反応により、該目的核酸の存在下で選択的に該LCRにおいて鋳型として機能し得る分子集団を増加させ、該目的核酸の不在下で該LCRにおいて機能し得る有害量の鋳型分子の生成を実質的に防ぎ、該鋳型依存制御反応が、目的鎖にハイブリダイズし得るライゲート可能な第一セットの核酸プローブを、目的鎖の相補体またはライゲートした第一プローブにハイブリダイズし得るライゲート可能な第二セットのプローブに対して実質的に過剰量にて供給し、ついで、該第一セットのプローブを鋳型依存的にライゲートさせることからなり、該制御反応において該第二セットのプローブを、目的鎖とは独立な有害なライゲーションを実質的に防ぐのに十分な低濃度にて供給する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の目的核酸に対してリガーゼ連鎖反応(LCR)を行う方法において、該LCRを行う前に第一鋳型依存制御反応により、該目的核酸の存在下で選択的に該LCRにおいて鋳型として機能し得る分子集団を増加させ、該目的核酸の不在下で該LCRにおいて機能し得る有害量の鋳型分子の生成を実質的に防ぎ、該鋳型依存制御反応が、目的鎖にハイブリダイズし得るライゲート可能な第一セットの核酸プローブを、目的鎖の相補体またはライゲートした第一プローブにハイブリダイズし得るライゲート可能な第二セットのプローブに対して実質的に過剰量にて供給し、ついで、該第一セットのプローブを鋳型依存的にライゲートさせることからなり、該制御反応において該第二セットのプローブを、目的鎖とは独立な有害なライゲーションを実質的に防ぐのに十分な低濃度にて供給する、ことを特徴とする方法。

【請求項2】 該制御反応において目的相補鎖の配列を含有する増幅生成物は実質的に生成されず、該第一制御反応のための実質的に唯一の鋳型が該目的核酸である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該第一制御反応に使用した容器とは別の容器において同時平行鋳型依存制御反応をさらにに行い、該同時平行制御反応が、該目的相補鎖に対応する配列を含有する生成物を選択的に生成させ該目的鎖に対応する配列を含有する生成物は実質的に生成させないように偏重させた反応からなり、該第一制御反応の生成物を該同時平行制御反応の生成物と混合する工程をさらに含み、該混合物においてLCRを行う、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 該鋳型依存制御反応が、該LCRプローブのセットのうち少なくとも一方のセットを平滑末端ライゲーションを実質的になくすのに十分に低い濃度で使用したりガーゼ連鎖反応からなる、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 一方のプローブのセットの濃度が他方のプローブのセットの濃度の約10倍である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 反応容器の容量が20～50 $\mu$ lであり、該一方のセットのLCRプローブについての両プローブの濃度が10<sup>11</sup>分子以下である、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 該制御反応が、鋳型依存重合工程および鋳型依存ライゲーション工程からなり、該ライゲーション工程が、有害量の平滑末端ライゲーション生成物を実質的に生成させない鋳型依存ライゲーションからなる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 該重合工程を第一に行い、該ライゲーション工程を第二に行う、請求項7に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、核酸配列の検出に関する。さらに詳しくは、リガーゼ連鎖反応(Ligase Chain Reaction; LCR)による核酸配列の検出において、バックグラウンドに対する相対的シグナルを目的配列に依存して増大させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 LCRの一つの側面には、試料中の特定核酸配列の存在の検出法が含まれる。LCRは、2セットの核酸プローブを用いた目的配列に依存したライゲーションを特徴とする。第一セットのプローブの成員は、末端と末端とが隣接した位置関係で目的鎖にハイブリダイズするように設計されている。かくして並んだ隣接プローブは、ホスホジエステル結合を鋳型に依存した仕方では生成させることによりライゲートさせる。かくして新たに生成した分子は、鋳型として機能し(目的配列相補体が存在していればそのように機能するように)、プローブの第二のペアのライゲーションを媒体して、さらに第一のペアのプローブをライゲートさせるための新たな鋳型を生成する(以下、同様に続く)。

【0003】 以下に一層詳細に記載するように、LCRの性能(power)は、ライゲートした各セットのプローブがさらにライゲートするための鋳型として機能し得ることによっており、そのことによって増大した(幾何級数的)速度にてライゲーションを生じる。すなわち、各サイクルによって、増大した数のライゲート目的配列含有分子が加えられるのである。LCRは、EPA-320308に開示されている。LCRは、特定ホスホジエステル結合を生成させることによって次のサイクルでそのような結合を生成させるための鋳型の数を増幅させることから、LCRはまた増幅法としても特徴付けられる。ここで、核酸の合成という意味でLCRが増幅法であるというのではない。LCR生成物は、提供したプローブの配列に関する情報を有するが、該情報は目的鎖の配列情報と必ずしも同じではない。

【0004】 理想的には、上記鋳型に依存したライゲーションは、鋳型が存在する場合に、そして鋳型が存在する場合にのみ起こる。しかしながら、実際には、鋳型に依存しないライゲーションも同様に起こることがある。鋳型に依存しないライゲーションにより増幅可能な生成物が生じ、その結果、目的鎖の不在下でもバックグラウンドシグナルを生じ得る。さらに詳しく説明すると、該方法のほぼ全般を通じて、LCRプローブのセットは一般に目的DNAよりも有意に過剰量で存在している。これらの過剰な相補的プローブはお互いの間で自由にハイブリダイズして平滑末端二本鎖DNA分子を生成し、この分子が目的鎖とは独立にDNAリガーゼによって接合され(目的鎖に媒体されたライゲーションに比べれば実質的に低い効率ではあるが)、その結果、疑似鋳型が生成し、これが鋳型に依存したライゲーションの連鎖反応

3

を起こし、LCRにおいて偽りの「バックグラウンド」シグナルを生成することになる。

【0005】上記のようなLCR増幅における偽りのバックグラウンドを制御する一つの方法は、プローブの末端を修飾してライゲーション(所望でない平滑末端ライゲーションを含む)をさせないようにし、その後、鋳型に依存した仕方で該修飾を元に戻す方法である(バックマン(Backman)、ボンド(Bond)、カリーノ(Carrino)およびラフラー(Laffler)のEP-A-0439182参照)。

【0006】ウー(Wu)らは、「ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(Polymerase Chain Reaction)(エーリッヒ(Erlich)ら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、1989)、233~236頁」の中で対立遺伝子特異的増幅法を記載している。一つの観点において、ウーらは、PCRで富ませたDNA配列のために、LAR(「リガーゼ増幅反応」、LCRの別名)を対立遺伝子特異的検出システムとして用いることができることを示唆している。ウーらは、LCRを行う前に、最初の鋳型制御反応としてPCRを使用することを提案しているように思われる。

【0007】ウーらはまた、Genomics、4:560~569(1989)において種々の増幅法を再検討している。ウーらは、LAR(LCR)およびPCRの両方について検討している。一つの態様として、ウーらは、1セットのみのライゲート可能プローブを用いた(その相補的セットを用いない)一次(linear)LCR反応を記載している。しかしながら、ウーらは、最初の一次LCRの後に完全LCRを組み合わせることにより得られる利点については示唆も評価もしていない。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、制御された鋳型依存反応からなる第一工程を加えることによりLCR法を改良することができることを発見した。該鋳型依存反応において、LCRにおける鋳型依存ライゲーションに関与し得る鋳型群が増大され、LCRに関与し得る鋳型分子の有害量の鋳型非依存(すなわち、目的核酸の不在下での)生成が実質的に回避される。ここで「有害量」とは偽りの鋳型の量を意味し、該偽りの鋳型は該最初の制御反応を行わないLCRに比べて感度を制限するものである。本発明の一つの態様において、該制御反応は、有害な平滑末端ライゲーションを実質的に回避させるように制御もしくは偏重させた(weighted)鋳型依存ライゲーションである。

【0009】さらに詳しく説明すると、制御ライゲーションの一つの好ましい態様において、目的相補鎖に対応する配列を有するライゲーション生成物に比べて、目的鎖の配列または目的鎖に対応する配列(たとえば、目的鎖と同一の配列または目的鎖とハイブリダイズし得るプローブをライゲートすることにより調製した配列)を有

4

するライゲーション生成物を選択的に生成するように該最初の鋳型依存ライゲーションを著しく偏重させる(本明細書において「2つの目的鎖」または「目的鎖および目的相補鎖」なる語は、最初の目的鎖が二本鎖である場合のみならず、目的鎖が最初一本鎖であってもライゲーション反応により一本鎖目的鎖の少なくとも一部にハイブリダイズし得るライゲーション生成物を速やかに生成する場合にも用いる。従って、本明細書においては、もともと一本鎖としてのみ存在する目的鎖のためのアッセイを記載する際に、第一および第二目的鎖なる語は目的鎖および目的相補鎖なる語と交互に同じ意味で用いる)。

【0010】本発明の好ましい態様において、目的鎖の一方の鎖が、實際上、鋳型制御ライゲーションに関わる。というのは、鋳型により生成したライゲーション生成物をさらに増幅用に用いるための手段(すなわち、試薬)が實際上、殆どまたは全く提供されていないからである。好ましい極端な場合には、そのような二次的なライゲーションのための手段が全く提供されておらず、また制御反応においてはライゲーションはライゲーションのサイクル数の実質的な一次関数である。そのような理由から、最初の制御ライゲーション工程を、ホスホジエステル結合の一次増幅または「一次プレ増幅」とも呼ぶ。上記最初の反応は通常10~50サイクルからなるが、100サイクルまたはそれ以上行ってもよい。

【0011】本明細書において、一方の鎖の配列に対するライゲーション数が「選択的に」起こるとか、一方の鎖のライゲーションの方に反応が「偏重される」という場合、それは、第一の工程において一方の目的鎖からの方が第二の目的鎖からよりも優先的に生成物が生成することを意味している。このことは、主として、2つのそれぞれの鎖に選択的に働く試薬(プローブ)の比率を変えることにより行うことができる。この比率は、1:1(各鎖に働く試薬を等量で用いる)から無限大(一方の鎖に働く試薬は存在しない)まで連続的に制御することができる。本発明の第一の観点の好ましい態様においては、この制御反応の特徴は、1セットの第一核酸プローブを提供し、ついで該第一プローブを鋳型に依存した仕方でライゲートさせて、該第一の目的配列にハイブリダイズし得る分子をさらに生成させることである。しかしながら、「第二」プローブは提供しない。

【0012】本発明の第一の観点の他の好ましい態様は、DNAリガーゼが平滑末端ライゲーションに比べてニック(nicked)部位をライゲートする(すなわち、鋳型依存ライゲーション)ことを決定的に優先するという事実を利用するものである。詳しく説明すると、所望の鋳型依存ライゲーションは通常に効率的であり、しかも、濃度の低下による該効率の減少は平滑末端ライゲーションの場合に比べてゆっくりとしているのである。それゆえ、最初の制御工程において少なくとも一方のプローブセットの濃度を非常に低く保持しておけば平滑末端ライ

ゲーションの起こる機会は無視できるほど小さくなる。選択されたプローブセットの濃度は100倍まで下げることができるが、約10倍の下げで充分であると思われる。たとえば、制御反応工程において、標準反応容器(20~50 $\mu$ l)当たり各プローブの濃度を10<sup>11</sup>プローブまたはそれ以下とするのが好ましい。これは、50 $\mu$ l当たり約10<sup>12</sup>の標準LCRプローブ濃度と対比される。

【0013】ライゲートしたプローブの増加率はプローブ濃度を減少させることによって減少するが、そのような減少は最初の制御工程においては許容し得るものである。該最初の制御工程は、ライゲートした種を検出可能な量で直接提供するよりも、むしろ標準LCRのために最初に存在する鋳型の数を増加させるために行われるからである。要約すると、本発明は、平滑末端ライゲーションの危険性を相対的に最小に抑えながら、所望でない平滑末端ライゲーションと所望の鋳型依存ライゲーションとの相対効率の差を利用してLCR鋳型を鋳型に依存した仕方で生成させるものであり、それにより、その後に行うLCR反応の結果を改善するものである。

【0014】上記本発明の第一の観点における2つの好ましい態様は、連続体の両極端を表すものである。すなわち、一方において相補的プローブを用いることなく一つの目的鎖に対する両プローブを標準濃度で用い、他方において両方の鎖に対する両プローブを低濃度で用いる。本発明がこの連続体の中間部分も包含することは当業者であれば理解できるであろう。すなわち、両方の鎖に対するプローブを用い、一方の鎖に対するプローブの集団の方に傾き、プローブ二本鎖の生成および平滑末端ライゲーションの起こりやすさが有害とならないように濃度を制御する。たとえば、少なくとも一方のプローブセットについて50 $\mu$ l容器当たり10<sup>11</sup>分子以下のプローブが上記のように存在してよい。

【0015】本発明の第二の観点は、最初の制御工程で核酸(好ましくはDNA)重合を用いてLCRの鋳型を生成させることを特徴とする。重合は鋳型に依存するので、重合伸長生成物の生成には一般に意図する目的配列の存在を必要とする。重合伸長生成物が意図する目的鎖以外の部分から生成される限りにおいて、そのような生成物はその後のLCRに有意な影響を与えないであろう。というのは、そのような生成物は鋳型として働かないからである。従って、標準PCR、または他方の鎖に対して一方の鎖を選択的に増幅させるように偏重させた重合は最初の制御反応として機能し得る。PCRを最初の制御反応として用いた後にLCRを行うことによる顕著な利点は、偽りのPCR伸長生成物からのシグナルを排除することにより、PCRを単独で行った場合に比べて特異性が増大する結果になることである。

【0016】本発明の第二の観点の一つの態様において、制御反応は、目的分子(TM)の一方の鎖の3'末端

からライゲーション部分(その後のLCRで起こる)に相補的な単一のプライマー核酸配列のコピーを、核酸ポリメラーゼ、および鋳型依存重合に適したヌクレオシド三リン酸(デオキシヌクレオシド三リン酸をも包含し、むしろこの方が好ましくさえある)とともに提供することからなる。通常のPCRとは異なり、この場合のPCRでは、通常のPCRにおいて通常用いる他の鎖に対するプライマーは殆どまたは全く提供されない。それゆえ、この方法は、「非対称PCR」と呼ばれる。

【0017】このポリメラーゼに基づく制御工程も、上記リガーゼに基づく制御工程と全く同様に連続的なものである。そのような試薬は、まずプライマーを目的核酸配列にハイブリダイズさせ、ついで得られたハイブリッドをポリメラーゼおよびヌクレオシド三リン酸と反応させて伸長生成物/鋳型を生成するサイクルの繰り返しに用いられる。変性させると、第一の目的鎖の配列にハイブリダイズし得る一本鎖伸長生成物配列を生じる。ついで、このサイクルをある回数繰り返す。

【0018】上記2つの制御反応(重合およびライゲーション)は、順番に行うことができる。重合を先に行うのが好ましい。また、いずれかのタイプの制御反応(重合またはライゲーション)を用いる場合は、上記のように一方の鎖に対応する配列を生成するように反応を偏重させることができる。第二の同時平行制御反応を別の容器で行ってもよく、該第二の反応は第二の目的鎖に対応する配列を生成するように偏重させる。ついで、これら2つの制御増幅工程の生成物を混合し、LCRに供する2つの目的鎖の配列集団がほぼ等しくなるようにする。

【0019】上記制御反応態様を行った後、標準LCRアッセイを行って幾何級数的な増幅を達成させる。該アッセイにおいて、両方の目的鎖配列に対応する配列を有するプローブをライゲートさせ、各ライゲーション生成物はその後のライゲーションの鋳型として機能する。詳しく説明すると、幾何級数的工程において、第一核酸プローブは一つの目的核酸配列の隣接部分にハイブリダイズし、鋳型(もともとの目的鎖の相補体か、または最初の目的鎖の存在に依存した仕方でプローブがライゲートすることにより生成したライゲーション生成物)の存在に依存した反応によりライゲートされる。つぎに、上記ライゲートした第一プローブにハイブリダイズした第二核酸プローブを鋳型に依存した仕方でライゲートさせて、その後のサイクルで第一プローブをライゲートさせるための鋳型をさらに生成させる。それゆえ、第一の増幅工程のライゲーション生成物はLCRによる幾何級数的ライゲーションに供される。

【0020】本発明の第三の観点は、上記(ライゲーションに基づく)一次増幅を行うための一次増幅/LCRキットに関し、該キットはDNAリガーゼ、少なくとも一つの核酸プローブセット、鋳型依存ポリメラーゼ、上記プライマー配列、およびポリメラーゼによる

重合に適したヌクレオシド三リン酸からなる。リガーゼおよびポリメラーゼの両方とも熱安定性であるのが好ましい。

【0021】本発明は、平滑末端ライゲーションによる偽りの(鑄型に依存しない)シグナルを回避させる工程において目的鎖を含有する分子の数を増加させることにより、感度を実質的に高めることができる。本発明はまた、試薬濃度、およびサイクル数などの他のブレ増幅変数を制御することにより最終的なLCRシグナル感度を最適化することができる。

【0022】本発明の利点を評価する一つの方法は以下の通りである。上記理由により、目的配列の不在下でさえも、十分なサイクル数の後では偽りのバックグラウンドシグナルが殆ど常にLCRにおいて生じるであろう。アッセイの評価は、目的鎖の存在下で確実にシグナルを生じるLCRサイクル数と目的鎖の不在下でシグナルを生成しやすいサイクル数とで規定される「窓口」(サイクル数にて)により行うことができる。本発明によれば、LCRの前の制御鑄型依存反応により、目的鎖の不在下でバックグラウンドシグナルが現れるサイクル数を実質的に減少させることなくシグナルを生成するのに必要なLCRサイクル数を減少させることによって、この「窓口」を広げることができる。

【0023】また、本発明の利点は、アッセイの感度の向上により評価することもできる。言い換えると、標準LCRに比べて、本発明の最初の制御増幅は目的鎖を含有しない試料から目的鎖を含有する試料を識別する能力に優れている。つぎに、本発明を図面に基づいて説明する。図1において、一本鎖核酸目的分子(たとえば、DNA)(以下、「TM」ともいう)は、既知の核酸配列目的配列(以下、「TS」ともいう)を含んでいる(TSはTMのすべてである必要はないことに注意)。分子TMは試料中で一本鎖分子として存在してよい。試料はまた二本鎖(ハイブリダイズした)目的鎖分子を含有していてもよいが、その場合は便宜的に一方の鎖をTM、他方の鎖をTM'と呼ぶことにする。同様に、TS'はTSに相補的な配列を示す。

【0024】図1において、本発明による制御増幅をTSにハイブリダイズしたプローブP1およびP2の鑄型依存ライゲーションにより示す(図1、工程A)。変性するとライゲートしたP1・P2はTMから分離される。このP1・P2はP1およびP2のライゲーションのための鑄型として機能し得ないことに注意すべきである。各サイクルは、(a)一本鎖TSを用意し、(b)P1およびP2をTSにハイブリダイズし、(c)P1およびP2を鑄型(TS)に依存したライゲーション反応によりライゲートしてTS-P1・P2二本鎖を生成させ、ついで(d)得られたTS-P1・P2二本鎖を変性させて配列TSを有する最初の鑄型分子およびライゲートした相補的分子P1・P2を生成させる、ことからなる。各サイ

クルにおいて特定収量のP1・P2が得られ、この収量は最初に存在する目的TSのみの関数である(一次相においてTS配列は生成されない)。相補的なP1'およびP2'配列は存在していないので、P1およびP2が平滑末端(鑄型に依存しない)ライゲーションによる偽りのバックグラウンドに貢献することは実際上ない。

【0025】所望の数の一次ブレ増幅サイクルの後、LCR工程(図2)において、一次ブレ増幅のP1・P2生成物を増幅させるためにプローブP1'およびP2'を添加する。P1・P2生成物の存在下での幾何級数的LCR増幅により、予測可能なサイクル数以内にシグナルが生成する。多くの場合、最初の制御増幅なしでLCRを目的鎖に直接適用したときは、シグナルを生成させるのに一層多くのLCRサイクル数が必要である。このように本発明は、所望でない平滑末端ライゲーション生成物が、鑄型により生成したシグナルを生じるサイクル範囲でLCRシグナルを生成するのに充分な量で存在する機会を実質的に少なくする。

【0026】図3では、図1に示したライゲーションとは対照的に一次ブレ増幅を重合により達成させる。この場合も、目的分子TMの目的配列TSは相補的配列TS'のコピーを生成させるのに用いられる。TSの3'末端に相補的な配列Cを有するプライマー配列Prを用意する。もちろん、このプライマーは、目的分子(TM)の3'末端からライゲーション部分(その後のLCRが起こる)にハイブリダイズさせるためにのみ必要である。配列CをTSにハイブリダイズさせ、ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸を加えて鑄型に依存した仕方配列Cを伸長させてTS'の付加コピーを含有するPr・TS'を生成させる。上記ライゲーションに基づく制御反応と同様に、複数のサイクルの結果は複数のコピーとなるが、それらコピーは該一次工程においてさらに増幅させるための鑄型としては機能しない(第二プライマーは除いてあるので)。

【0027】リガーゼかまたはポリメラーゼ酵素のいずれかを用いる制御ブレ増幅法は、LCRの感度を高めるのに有用である。たとえば、制御した最初の増幅は、制御した最初の増幅を行わないコントロールに比べてシグナル/ノイズ比を増加させる。標準LCRアッセイに比べてアッセイの感度が向上するという点で評価するとき、制御増幅は感度を10倍またはそれ以上高め、それゆえ目的鎖を含有しない試料から所望の目的鎖を含有する試料を識別する能力が高められる。

【0028】一般に、制御増幅は10~100サイクル行う。ついで、試料中に存在する酵素の活性を失活させるのに充分な温度にて試料を加熱処理する。最初の制御増幅がリガーゼに基づく増幅である場合は、この工程は任意的なものである。必要なら、ついでLCR反応を支持するため当業者に知られた仕方で反応混合物を適当に調節する(緩衝液、pH等)。

【0029】完全なLCRプローブセットとして機能するに十分な濃度でオリゴヌクレオチドをさらに加え、また新たなリガーゼを加えてもよく、目的鎖に富んだ試料でLCRを行う。一般に、オリゴヌクレオチドは、幾何級数相において10~100nM、さらに好ましくは30~100nMの最終濃度にて等量で用いる。リガーゼ一次増幅反応のためにオリゴヌクレオチド、試薬およびサイクル条件に関してさらに考慮すべき点は幾何級数LCRの場合と同じであり、EP-A-320308に一般に開示されている。制御ポリメラーゼ反応に用いることのできる条件は、一般にマニアティスらのモレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)(1981コールドスプリングハーバー)およびパネット(Panet)およびコラナ(Khorana)(1974)J. Biol. Chem. 249: 52\*

3'-...TTAAGCTCGA GCCATGGG-CC CCTAGGAGAT CTCAGCTGGA CGT...-5'

この目的配列のブレ増幅に使用するため該目的配列にハ ※【化2】  
イブリダイズするように下記プローブを設計した。 ※

A 5'-AATTCGAGCT CGGTACCC ID No 1  
B 5'-GGGGATCCTC TAGAGTCGACC TGCA ID No 2

【0031】プライマーAおよびB並びにそれらの相補体(A'およびB')の調製は、アプライドバイオシステムズモデル380Bを用いて標準法により行った。パーガー(Berger)およびキメル(Kimmel)(1987)のガイド・トゥー・モレキュラー・クローニング・テクニックス(Guide to Molecular Cloning Techniques)438頁以下に記載の一般法により、プライマーA'およびBをポリヌクレオチドキナーゼおよびATPで処理して5'末端をリン酸化した。トゥー(Tu)およびコーエン(Cohen)(1980)のGene 10: 177~183に記載の一般法により、ターミナルトランスフェラーゼおよび<sup>32</sup>P-dCOTP[コルデシピン(Cordecypin)]で処理してプライマーA'の3'末端を放射性標識した。

【0032】熱安定リガーゼの調製は、EP-A-0373962に記載の方法に従って行った。「1×LCR緩衝液」(すなわち、50mM EPPS、pH7.8、100mM KCl、10.0mM MgCl<sub>2</sub>、1.0mM ジチオトレイトール、1.0mM NH<sub>4</sub>Cl、10μg/ml ウシ血清アルブミン)および100μM NAD、20μg/ml 担体DNA(ウシ胸腺DNAなど)並びに等量のプライマーAおよびB(各85nM)を含有する試料を調製した。熱安定リガーゼの存在下、1000個の目的鎖分子を含有する試料について制御増幅を行った。単一のサイクルは下記工程からなっており、一次または幾何級数のいずれかのリガーゼ媒体増幅と同じであった。(a)90℃で1分間加熱してDNAを変性させる。(b)50℃で1分間インキュベートして隣接プローブをアニールおよびライゲートさせる。

【0033】50サイクル後、反応を停止させ、10分間沸騰させてリガーゼを変性させた。ついで、この「ブレ増幅」試料にLCRプローブセットの他の2つのプロ

\*13~5221に開示されている。この重合は、一つのプライマーのみを用いる点で米国特許第4,683,202号および同第4,683,195号に開示されているものとは異なっている。

【0030】

【実施例】つぎに、本発明を実施例に基づいてさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

実施例1(ライゲーションによる制御増幅)

10 下記二本鎖目的DNA配列は、市販のベクターpUC19中に存在している。単純化するため、一本鎖で示してある。配列中の「-」は、プローブのライゲーションを行うと意図している点を示す。

【化1】

20 プローブ(A'およびB';各80nM)および新たなリガーゼを加え、サイクルをさらに20~50サイクル行った。種々の時点で試料を採取し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびオートラジオグラフィーにより分析した。コントロールとして、4つのプローブおよび0または1000の目的鎖を用いて標準LCR反応を行った。試料を採取し、ブレ増幅反応と同様にして分析した。

30 【0034】目的鎖配列を含有しないコントロール試料からは特徴的な動力学的シグナルが得られ、1000個の目的鎖配列を含有する試料(しかし、制御増幅は行わない)からは非常に似た動力学的シグナルが得られた。しかしながら、最初の制御増幅に供した目的鎖含有試料中のシグナルは、他の場合に比べてLCR(幾何級数的増幅)手順において少なくとも4~6サイクル早く出現した。それゆえ、制御増幅から開始することにより、ブレ増幅を行わない場合には識別が困難であるときに1000個の目的鎖をバックグラウンドから容易に識別することができる。このことにより、一次ブレ増幅を行わないときには確実にを行うことが不可能であるような目的鎖の数の同定が可能となり、感度が高められる。

40 【0035】実施例2(重合による制御増幅)

重合による一次ブレ増幅もまた、LCRアッセイの感度を高める。実施例2でも実施例1と同じ目的鎖およびプローブ配列を用いる。1000個の目的鎖を含有する試料に、単一のオリゴヌクレオチドプローブAのみを加える。上記マニアティスらの文献に記載の方法に従って、熱安定DNAポリメラーゼ、緩衝液、およびdNTPsを加える(重合に関する上記文献も参照)。50回のハイブリダイゼーション、伸長および変性サイクルを行う。ついで、反応を停止させ、10分間沸騰させてポリメラーゼの活性を失活させる。

【0036】全ブレ増幅試料をエタノール沈殿させ、遠心分離にかけ、残留する塩をエタノール洗浄により除き、沈殿を乾燥させた。ついで、この沈殿を標準LCR反応混合物中に再懸濁し、プローブA、B、A'、B' (各プローブにつき80nM)を加え、熱安定リガーゼを加え、LCRを行った。1000個または0個の目的鎖を含有するコントロールについても行った。

#### 【0037】実施例3 (連続制御増幅)

実施例1に記載の目的鎖およびプローブ配列を用い、1000個の目的鎖を含有する試料に単一のオリゴヌクレオチドプローブAを加える。実施例2に記載のようにしてポリメラーゼに基づくブレ増幅を行う (沈殿、洗浄、LCR緩衝液中への再懸濁およびリガーゼ酵素の添加を含む)。実施例2とは違って、プローブA'およびB'のみを加え、プローブBは加えない。プローブBの不在下\*

5'-AGGTTGTAAG CACGGATGAA TATGT-TGCAC GCACAAACAT ATATTATCAT G-3'

目的配列のブレ増幅に使用するため、上記目的配列にハイブリダイズするように下記プローブセットを設計した。これらプローブは標準法により合成した (F1=F※

179.1	F1-AAGTTGTAAG CACGGATGAA TATGT-3'	ID No 3
179.2	5'-ACATATTCAT CCGTGTCTAC AACT-F1'	ID No 4
179.3	5'-TGCACGCACA AACATATATA TTACA-Bio	ID No 5
179.4	Bio-ATGATAATAT ATGTTTGTGC GTGCA-3'	ID No 6

【0039】プローブ179.1の5'末端は、下記IMx MEIAアッセイに使用するためフルオレセインでハプテン化した(haptenated)。下記式:

#### 【化5】

5'-XAAGTTGTAAGCACGGATGAATATGT-3'

で示されるオリゴヌクレオチド(ID No 3)(式中、XはアミノモディファイアーI I<sup>1</sup>(クロンテック))(0.378A<sub>260</sub>単位/μL)の溶液(15μL)を、暗所、室温にてホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.2; 485μL)中に溶解したフルオレセインイソチオシアネート(FITC、コダック; 4mg)で15時間処理した。過剰のFITCをNAP-5カラム(ファルマシア)上で除き、溶解液をスピードバック<sup>TM</sup> [サバン・インスツルメンツ(Savant Instruments)]上で容量100μLに濃縮した。

【0040】この溶液をホルムアミド(200μL)で希釈し、試料を厚さ1.5mmの12%アクリルアミド/8M尿素ゲル上、40Wの定電力で電気泳動にかけて分離した。5時間後に電気泳動を停止させ、ゲル上の生成物バンドを長波UV陰影化により視覚化した。生成物は非標識出発物質に比べて移動度が低かった。FITC-オリゴバンドを切り出し、1.0M酢酸トリエチルアンモニウム(3ml)で一晩抽出し、得られた水性抽出物を凍結乾燥した。残渣を蒸留水中で再構成し、ついでNAP-5で脱塩した。ハプテン化した後、得られたプローブをトリス-EDTA緩衝液(10mMトリス、1mMEDTA)中に1012分子/μLに希釈した。

【0041】5'アミノモディファイアーI I<sup>1</sup>の代わ

\*では幾何級数的増幅は起こらず、それゆえ、第二の一次増幅工程が開始される。この一次反応は50サイクル行い、この時点で実施例1と同様にして反応を停止させ、新たな熱安定リガーゼおよびプローブBを加え、幾何級数的増幅を20~50サイクル行う。コントロールは前記実施例と同様にして行っている。

#### 【0038】実施例4 (IMx<sup>3</sup>装置での検出を伴う制御増幅)

下記配列を有する二本鎖DNA (ヒトパピローマウイルスタイプ16のL1領域から採取)を目的鎖として用い、一次ブレ増幅を行った。該配列は、単純化するため一本鎖で示してあり、配列中のハイフンはライゲーション部位を表している。

#### 【化3】

※ルオレセイン、Bio=ビオチン。

#### 【化4】

りに3'-アミノCPG(グレン・リサーチ)を用い、プローブ179.2(ID No 4)の3'末端を上記と同様にしてハプテン化した。このプローブをポリヌクレオチドキナーゼで処理し、10<sup>12</sup>分子/μLに希釈した。

【0042】プローブ179.3の3'末端を下記のようにしてハプテン化した。下記式:

#### 【化6】

5'-TGCACGCACAAACATATATTATCAX-3'

で示されるオリゴヌクレオチド(ID No 5)(式中、Xは3'-アミノCPG(CPG=制御多孔質ガラス; グレン・リサーチ))(0.378A<sub>260</sub>単位/μL)の溶液(35μL)を、100mMリン酸緩衝液/DMF(pH7.5)(215/250μL)中のビオチン-(アミノカプロイル)2-NHS活性エステル(クロンテック; 10mg)で室温にて15時間処理した。フルオレセインの場合と同じ手順および電気泳動により短波UV陰影化で生成物バンドが得られ、このものは出発物質よりも4塩基分だけ移動が遅かった。切り出しおよび抽出を行い、フルオレセインの場合と同様にして脱塩を行った。このプローブをポリヌクレオチドキナーゼおよびATPで処理して5'末端をリン酸化し、10<sup>12</sup>分子/μLに希釈した。

【0043】プローブ179.4(ID No 6)の5'末端を上記と同様にしてハプテン化し、10<sup>12</sup>分子/μLに希釈した。下記50μL容量中で各一次ブレ増幅を行った。

(μL)

13

dH <sub>2</sub> O	32.75
5×LCR緩衝液	10.0
10mM NAD	0.5
179.1(10 <sup>12</sup> 分子/μL)	0.5
179.3(10 <sup>12</sup> 分子/μL)	0.75
目的鎖(種々の濃度)	1.5
1×リガーゼ(1単位が1分間当たり に1μMのニックDNAを封じる場合、 2~10×10 <sup>6</sup> 単位)	1.0 50.0

【0044】可能な場合は、一層大きなプール容量の反応容量から調製し、これをアリコートに分割した。個々の各反応液に鉱油(30μL)を重層した。各反応アリコート(リガーゼを除く)を100℃に3分間供して目的鎖を変性させ、ついで85℃に30秒間および50℃に20秒間供した。ついで、リガーゼ(1μL)を加えた。こ\*

#### ストック溶液#1

6.3μL	10×LCR緩衝液
4.5μL	10mM NAD
6.2μL	H <sub>2</sub> O
4.5μL	10 <sup>11</sup> オリゴヌクレオチド/μLの各プローブ
10.0μL	Cot <sup>32</sup> P-(コルデシピン)標識プローブ

#### ストック溶液#2

2.0μL	10×LCR緩衝液
4.4μL	10 <sup>12</sup> オリゴヌクレオチド/μLの各プローブ

【0047】溶液#1(10μL)のアリコートを、バックグラウンドDNA(3.0μL)とともに、目的鎖を用いたまたは用いずに4つの各0.65ml容エッペンドルフチューブに入れた。LCR反応を開始させ、20サイクル続けた。このチューブを遠心分離でしばらく回転させ、90℃に戻した。溶液#2(4.0μL)を各チューブに加え、標準LCRと同様にして温度サイクルを続けた。図5は、コントロール(標準LCR)および最初の制御(低濃度プローブ)ライゲーション(「ICL」と称する)を行った場合の結果を示す。

【0048】実施例6(最初の制御反応としてのPCR)プライマーAおよびB(表1)を用い、幾つかの囊胞性繊維症(CF)群から得たゲノムDNA試料からCF遺伝子をPCRにより増幅した。PCRは30サイクル行った。各サイクルは、94℃で60秒間のインキュベーション、62℃で43秒間のインキュベーション、および72℃で120秒間のインキュベーションからなっていた。

【0049】PCRの後、反応生成物を水で1:200に希釈し、1μLアリコートをLCR反応の目的鎖として、正常CF対立遺伝子および主要な欠損CF対立遺伝子(3つのヌクレオチドが欠失している)[リオーダン(Riordan, J.R.)ら、Science 245:1066(1989); ケレム(Kerem, B.)ら、Science 245:1073(1989)]に特異的なプローブセットとともに用いた。正常および欠失CF対立遺伝子の増幅に用いるLCRプローブは、表1に示してある。プローブC'、E'およびD'を実施例1と同様にしてリン酸化した。LCRを25サイクル行った。各サイクルは、85℃で30秒間のインキュベーション、および50℃で20秒間のインキュベーションからなっていた。

\*のブレ増幅反応を50熱サイクル(85℃で30秒の後、50℃で20秒)行った。

【0045】LCR幾何級数増幅相は、下記成分のプールの3μLアリコートを加えることにより行った。

dH <sub>2</sub> O	1.75μL
179.2(10 <sup>12</sup> 分子/μL)	0.75μL
179.4(10 <sup>12</sup> 分子/μL)	0.5μL

LCR反応は30サイクル行った。適当なコントロールについても行った。一次ブレ増幅を行う場合と行わない場合との比較条件下におけるLCRを比較すると、図4に示すように一次ブレ増幅は感度を有意に高めた。

【0046】実施例5(最初のプローブの濃度を減少させること)本実施例では、平滑末端ライゲーションを制御するための方法としてプローブの濃度を下げることによる鋳型依存ライゲーションを記載する。下記ストック溶液を調製した。

9))に特異的なプローブセットとともに用いた。正常および欠失CF対立遺伝子の増幅に用いるLCRプローブは、表1に示してある。プローブC'、E'およびD'を実施例1と同様にしてリン酸化した。LCRを25サイクル行った。各サイクルは、85℃で30秒間のインキュベーション、および50℃で20秒間のインキュベーションからなっていた。

【0050】正常対立遺伝子の同定のため、オリゴヌクレオチドC'およびDを7.5×10<sup>11</sup>分子/反応にて、およびオリゴヌクレオチドEおよびD'を5×10<sup>11</sup>分子/反応にて用いた。欠失対立遺伝子に対しても、オリゴヌクレオチドC'およびDを7.5×10<sup>11</sup>分子/反応にて、およびオリゴヌクレオチドEおよびD'を5×10<sup>11</sup>分子/反応にて用いた。各場合の反応容量は50μLであった。LCRの後、反応生成物をIMx<sup>8</sup>MEIAアッセイにより分析した。選択した代表的な結果を表2に示す。すべての患者で「PCR陽性」であったが、LCRによりCF対立遺伝子を有するキャリアをCF対立遺伝子を有しないキャリアから識別することができた。

【0051】本実施例は、正常対立遺伝子を「真の」目的鎖とし欠失対立遺伝子を偽りの伸長とみた場合に本発明の改良を示している。表1

【表1】



15

## PCR プライマー:

A: 5'-GTTTTCCTGG ATTATGCCTG GGCAC-3'

B: 5'-GTTGGCATGC TTGATGACG CTTC-3'

ID No 7

ID No 8

## LCR プローブ:

## 正常遺伝子

C: P1-CACCATTAAG AAAATATCA TCTT-3'

ID No 9

C': 5'-AAGATGATAT TTCTTTAAT GGTGC-P1

ID No 10

D: 5'-TGCTGTTTCC TATGATGAAT ATAGA-Bio

ID No 11

D': Bio-CTATATTCAT CATAGGAAAC ACCA-3'

ID No 12

## 変異遺伝子

E: P1-TGGCACCATT AAAGAAAATA TCAT-3'

ID No 13

E': 5'-ATGATATTTT CTTAATGGT GCCAG-P1

ID No 14

D: 5'-TGCTGTTTCC TATGATGAAT ATAGA-Bio

ID No 15

D': Bio-CTATATTCAT CATAGGAAAC ACCA-3'

ID No 16

表2

【表2】

IMx	シグナル (カウント/秒 / 秒)	
	正常	変異
目的鎖なし	19	97
患者 1	1825	107
患者 2	1973	1997
患者 3	24	1946

他の態様も本発明に包含される。たとえば、実施例5の低濃度プローブ制御増幅を上記偏重増幅工程の1または2以上と組み合わせることもできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の1実施態様における一次プレ増幅工程を示す模式図である。

【図2】 一次プレ増幅工程の後に行うLCRを示す模

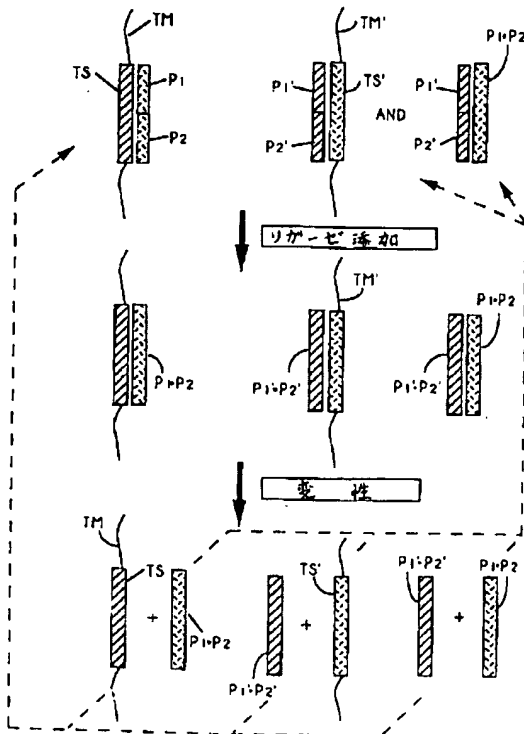
式図である。

【図3】 本発明の第二の実施態様における一次プレ増幅工程を示す模式図である。

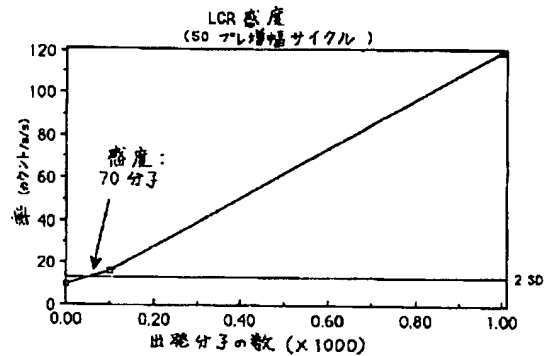
【図4】 実施例4におけるアッセイの結果を示すグラフである。

【図5】 実施例5におけるアッセイの結果を示すグラフである。

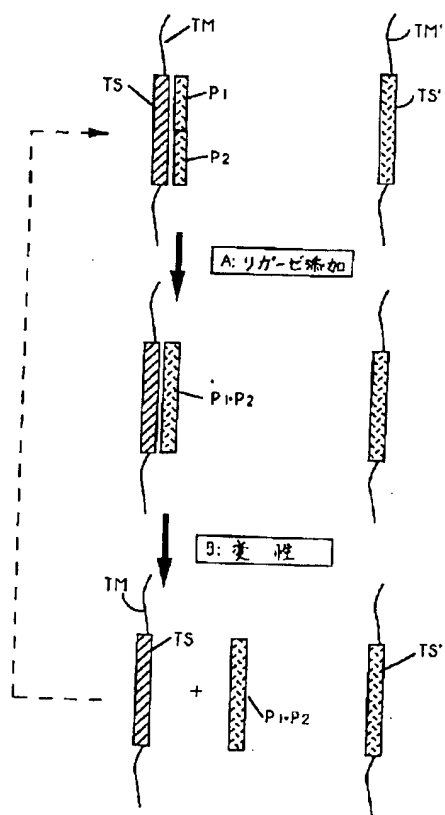
【図2】



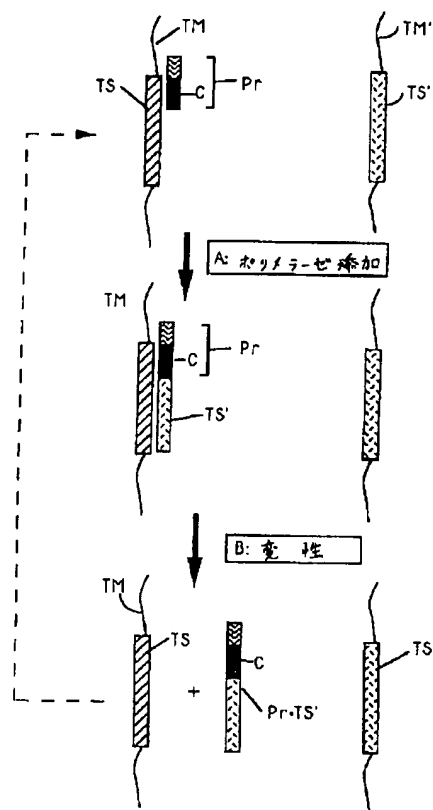
【図4】



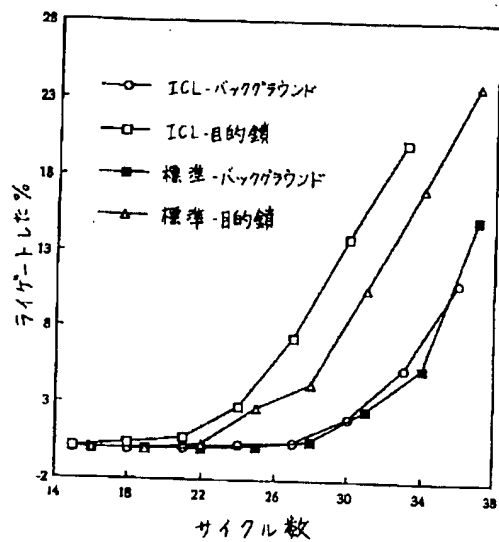
【図1】



【図3】



【図5】



## フロントページの続き

(72)発明者 ジョージ・エイチ・シヤイマー  
アメリカ合衆国02172マサチューセッツ州  
ウオータータウン、アーセナル・ストリー  
ト4751番 プランチ・オフィス12

(72)発明者 ジョン・ジエイ・カリノ  
アメリカ合衆国60031イリノイ州ガーニー、  
コンステイテューション・ストリート5774  
番